

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS EM PEIXES-ZEBRA SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

ANNA PAULA MONTEIRO DE SOUZA^{1,3}, GUSTAVO BEILKE^{2,3}, RICIERI MOCELIN^{3,4}

1 Introdução

A N-acetilcisteína (NAC) é amplamente utilizado na clínica como mucolítico, antídoto específico para overdose por paracetamol, na prevenção de doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras aplicações. Seu mecanismo de ação multifacetado vem sendo recentemente evidenciado, demonstrando potencial como adjuvante terapêutico no tratamento de diferentes transtornos mentais como ansiedade, depressão, esquizofrenia, dentre outros, além de eficácia na redução do abuso de substâncias como o álcool. A NAC aumenta os níveis de glutamato extra-sináptico que atua em receptores metabotrópicos, diminuindo a liberação de glutamato na fenda sináptica. Essa redução é benéfica por prevenir a excitotoxicidade e a ativação de receptores do tipo NMDA. Além do efeito indireto sobre receptores NMDA, um estudo pré-clínico demonstrou que a atividade tipo-antidepressiva pela NAC parece ser dependente da ativação de receptores AMPA. Além disso, a NAC apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como, neuromodulador de diferentes sistemas neurotransmissores, principalmente o sistema glutamatérgico. A modulação sobre esse sistema demonstra similaridade com o mecanismo de ação da cetamina que, aliado ao potencial sinaptogênico e neurotrófico, promove prevenção do dano oxidativo, excitotoxicidade e morte neuronal.

Moduladores glutamatérgicos, como a cetamina, são compostos promissores no tratamento de transtornos mentais. Um estudo clínico realizado em 2006 mostrou que uma dose subanestésica desse fármaco foi capaz de reverter os sintomas depressivos. Surpreendentemente esse efeito foi sustentado por uma semana. Recentemente, o FDA aprovou a esketamina

¹Graduando do 8º nível de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, contato: anna.souza@estudante.uffs.edu.br.

²Graduando do 6º nível de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, contato: gustavo.beilke@estudante.uffs.edu.br

³Grupo de Pesquisa: Neurociência Translacional, Clínica e Epidemiológica. Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, Bloco A, Sala 102.

⁴ Professor Doutor da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, contato: ricieri.mocelin@uffs.edu.br. (**Orientador**).

(SPRAVATO™, Jonhson & Jonhson) para o tratamento de pacientes com depressão maior não-responsivos a antidepressivos. SPRAVATO™ é um enantiômero S da cetamina sob formulação farmacêutica de spray nasal, disponível a um alto custo.

Nesse contexto, considerando o papel da NAC como neuromodulador de diversas vias relevantes aos transtornos mentais relacionados ao estresse, o objetivo do projeto foi investigar os efeitos da NAC sobre o *status* oxidativo em peixes-zebra adultos.

2 Objetivos

O objetivo desse projeto foi investigar o mecanismo neuroquímico da N-acetilcisteína (NAC) em peixes-zebra adulto submetidos a um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI).

3 Metodologia

Foram usados 24 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos com aproximadamente 4 meses de idade (proporção 50:50 machos: fêmeas) do tipo selvagem (*wild-type*, fenótipo short fin) para melhor representar a heterogeneidade e variabilidade genética da população.

Os peixes foram adquiridos em loja especializada (Delphis, Porto Alegre/RS), aclimatados em quarentena por 30 dias com densidade máxima de 2 peixes por litro. Após período de habituação, os animais foram transferidos para tanques de aclimação de forma randomizada totalizando 12 animais (6 machos e 6 fêmeas), mantidos durante 5 dias sobre condições ideais para a espécie, alimentados três vezes ao dia com ração comercial (Poytara, tropicais dia a dia, Araraquara/SP). Após 5 dias de aclimação, os peixes foram gentilmente transferidos em grupos de 6 animais para os respectivos tanques de exposição, expostos às 8:00 durante 20 minutos e retornando aos seus tanques moradia. A análise comportamental no teste de tanque novo foi realizada 24 horas após exposição. Os animais foram filmados individualmente durante 6 minutos e quantificados no software ToxTrac®. Posteriormente os animais foram eutanasiados por resfriamento e os encéfalos dissecados em gelo, homogeneizados, centrifugados e o sobrenadante armazenado (-80 °C), sendo feito um pool de 2 encéfalos de peixes-zebra para cada n, sendo o n de cada grupo experimental igual a 6. Os parâmetros avaliados foram: dano oxidativo aos lipídios pelo nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o dano oxidativo às proteínas pelos níveis de grupos tióis não proteicos (NPSH). O projeto foi aprovado pelo CEUA da UFFS sob número #6839180221.

Os dados foram considerados paramétricos e para a análise estatística foi realizado *test t* de *student* não pareado. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (S.E.M).

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

A figura 1 mostra os efeitos da N-acetilcisteína (NAC) no teste de tanque novo. Não foram observados efeitos da NAC na distância total percorrida (Fig. 1A), no número total de cruzamentos (Fig. 1B) entre as 3 áreas do aparato (topo, meio e fundo), no número de entradas tanto no fundo (Fig. 1C) quanto no topo do aparato (Fig. 1D), bem como a NAC não induziu alteração no tempo de permanência tanto no topo (Fig. 1E) quanto no fundo do aparato (Fig. 1F).

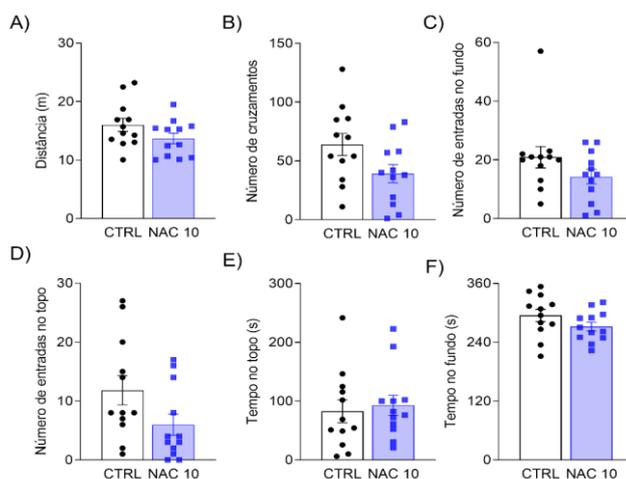


Figura 1. Efeitos da N-acetilcisteína (NAC, 10 mg/L) sobre parâmetros comportamentais no teste de tanque novo em peixes-zebra adulto. Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. $n=12$.

A figura 2 demonstra os efeitos da NAC sobre parâmetros de estresse oxidativo. Observamos que a exposição aguda a NAC por 20 minutos não induziu dano lipídico no teste de TBARS (Fig. 2A) e dano proteico no teste de NPSH (Fig. 2B).

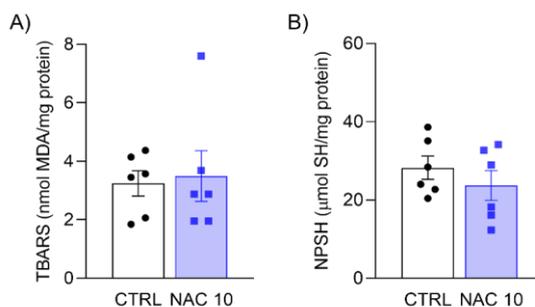


Figura 2. Efeitos da N-acetilcisteína (NAC, 10 mg/L) sobre parâmetros bioquímicos em encéfalo de peixes-zebra adulto. Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. $n=6$ (pool 2).

Os resultados aqui apresentados corroboram com dados da literatura demonstrando que a exposição aguda a NAC não induz dano locomotor, bem como efeito tipo-ansiolítico. Apesar

disso, é importante destacar a necessidade de realizar protocolos experimentais que visem induzir comportamento tipo-ansio gênico e dano oxidativo, como o estresse crônico imprevisível (ECI), a fim de demonstrar ou refutar nossa hipótese de que a NAC é capaz de reverter o comportamento ansio gênico e o estresse oxidativo induzido pelo ECI, de modo a definir possíveis contextos neurobiológicos envolvidos.

Nesse sentido, nosso próximo objetivo segue a segunda frente aqui descrita, sendo a investigação dos efeitos da exposição aguda a NAC após protocolo de ECI sobre parâmetros bioquímicos (*status oxidativo*) em peixes-zebra adulto.

5 Conclusão

A NAC não apresentou dano locomotor e oxidativo após exposição aguda. Apesar disso, nenhuma intervenção de estresse foi realizada para investigar os potenciais efeitos reversores da NAC. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para melhor avaliar a eficácia da NAC em transtornos mentais.

Referências Bibliográficas

- ABDALLAH, C. G. et al. The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 190, p. 148–158, out. 2018.
- BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 34, n. 3, p. 167–177, mar. 2013.
- CADDY, C. et al. Ketamine as the prototype glutamatergic antidepressant: pharmacodynamic actions, and a systematic review and meta-analysis of efficacy. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, v. 4, n. 2, p. 75–99, abr. 2014.
- DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, v. 36, n. 2, p. 78–86, mar. 2011.
- JIANG, Y. et al. Short- and long-term antidepressant effects of ketamine in a rat chronic unpredictable stress model. *Brain and Behavior*, v. 7, n. 8, p. e00749, 2017.
- KOIKE, H.; CHAKI, S. Requirement of AMPA receptor stimulation for the sustained antidepressant activity of ketamine and LY341495 during the forced swim test in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 271, p. 111–115, 1 set. 2014.
- KRYSTAL, J. H.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biological Psychiatry*, v. 73, n. 12, p. 1133–1141, 15 jun. 2013.
- LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists Rapidly Reverse Behavioral and Synaptic Deficits Caused by Chronic Stress Exposure. *Biological Psychiatry, Serotonin and Depression - Revisited*. v. 69, n. 8, p. 754–761, 15 abr. 2011.

- LINCK, V. M. et al. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behavioural Pharmacology*, v. 23, n. 2, p. 171–177, abr. 2012.
- MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, out. 2015.
- MCGOWAN, J. C. et al. Prophylactic ketamine alters nucleotide and neurotransmitter metabolism in brain and plasma following stress. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 9, p. 1813–1821, 2018.
- MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 7 ago. 2015.
- MOCELIN, R. et al. Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. *Neurochemical Research*, v. 43, n. 2, p. 458–464, fev. 2018a.
- MOCELIN, R. et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. *Molecular Neurobiology*, 6 jun. 2018b.
- MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 16, n. 7, p. 472–486, jul. 2017.
- POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 22–37, 30 nov. 2011.
- RIEHL, R. et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 6, p. 658–667, dez. 2011.
- SWANSON, C. J. et al. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 4, n. 2, p. 131–144, fev. 2005.
- ZANOS, P. et al. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, v. 533, n. 7604, p. 481–486, 26 2016.
- ZANOS, P. et al. Convergent Mechanisms Underlying Rapid Antidepressant Action. *CNS drugs*, v. 32, n. 3, p. 197–227, 2018.
- ZARATE, C. A. et al. Relationship of ketamine's plasma metabolites with response, diagnosis, and side effects in major depression. *Biological Psychiatry*, v. 72, n. 4, p. 331–338, 15 ago. 2012.
- ZARATE, C. A., Jr et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of general psychiatry*, v. 63, n. 8, p. 856–864, ago. 2006.

Palavras-chave: peixe-zebra; transtorno mental; comportamento; n-acetilcisteína; cetamina.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022-0327.

Financiamento: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Bolsa de IC (Edital 89/GR/UFFS/2022).